

2403-122661/103

787/3

## (12) PATENT SPECIFICATION

(10) DE 44 30 593 C 2

(21) Registration No.: P 4430593 1-41

(22) Filing date: 20.8.94

(43) Date of availability for public: 22.2.96

(45) Date of declaration of patent granting: 14.1.99

(73) Patent owner: Max-Delbrück-Centrum für Molekulare  
Medizin, 13125 Berlin, DE

(54) Process for producing liposome-encapsulated taxol

(57) A process for preparing a pharmaceutical composition, comprising liposome-encapsulated taxol with a high taxol content, characterized in that for encapsulating taxol a mixture of membrane-forming amphiphiles in which taxol is dissolved and an aqueous phase are subjected from one-fold to fifteen-fold high-pressure homogenization at a pressure of 50 to 1600 bar (5-160 MPa).

# Taxol in SUV

## Mammary gland carcinoma Ma Tu

Animals: Ncr:nu/nu female  
Tumor: Ma Tu subcutaneous  
Therapy: intraperitoneal

| Group | Number of mice | Substance            | Treatment (days) | Dosage (mg/kg/inj) | Toxic: Death (days) | BWC (%) d10-13 | Tumor growth |
|-------|----------------|----------------------|------------------|--------------------|---------------------|----------------|--------------|
| A     | 8              | Saline               | 10-13            |                    |                     | 1              | See Dwg.     |
| B     | 8              | Taxol                | 10-13            | 12.5               | 1 (16)              | -1             |              |
| C     | 8              | Taxol in SUV         | 10-13            | 12.5               | 2 (21, 32)          | 1              |              |
| D     | 8              | J918<br>Taxol in SUV | 10               | 50                 |                     | 2              |              |

Liposomes better than free taxol

Note: Single treatment = therapy during 4 days in succession (prolonged effect)

The same bodyweight in all the groups



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

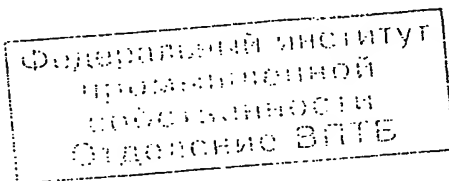
⑫ Patentschrift  
⑩ DE 44 30 593 C 2

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
A 61 K 31/335

②1 Aktenzeichen: P 44 30 593.1-41  
②2 Anmeldetag: 20. 8. 94  
④3 Offenlegungstag: 22. 2. 96  
④5 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 14. 1. 99

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE



⑥2 Teil in: P 44 47 770.8

⑦2 Erfinder:  
Reszka, Regine, Dr., 16341 Schwanebeck, DE;  
Brandl, Martin, Dr., 79102 Freiburg, DE; Fichtner,  
Iduna, Dr., 13125 Berlin, DE; Warnke, Gernot, Dr.,  
79102 Freiburg, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
WO 93 18 751  
Pharmaceut. Res. 11(6), 889-896(1994);  
Cancer Res. 53, 5877-5881 (1993);

⑤4 Verfahren zur Herstellung von Liposomal verkapseltem Taxol

⑤7 Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verkapselung des Taxols ein Gemisch von membranbildenden Amphiphilen, in denen Taxol gelöst wurde, und eine wäßrige Phase ein- bis fünfzigmal einer Hochdruckhomogenisation mit Drucken von 50 bis 1600 bar (5-160 Mpa) unterzogen wird.

Taxol in SUV  
Hämatokarzinom MaTu

Tiere: Normalnu weiblich  
Tumort: MaTu s.c.  
Therapie: Lp

| Gruppe | Zahl<br>d. Mäuse | Substanz             | Behandlung<br>id. | Dosis<br>(mg/kg) | Wachstum<br>Tumore (g) | UWG (%)<br>010-15 | Tumort<br>Wachstum<br>s Act |
|--------|------------------|----------------------|-------------------|------------------|------------------------|-------------------|-----------------------------|
| A      | 8                | Isotone              | 10-13             |                  |                        | 1                 |                             |
| B      | 8                | Taxol                | 10-13             | 12,5             | 1 (16)                 | -1                |                             |
| C      | 8                | Taxol in SUV<br>J91E | 10-13             | 12,5             | 2 (21,32)              | -                 |                             |
| D      | 8                | Taxol in SUV         | 10                | 50               |                        | 2                 |                             |

Anmerkung: Liposomen besser als freies Taxol  
Einmalige Behandlung: 4 Tiere pro 4 aufeinander folgenden Tagen (Dosisleistung: 1)  
gleiches Körpergewicht: in allen Gruppen

DE 44 30 593 C 2

DE 44 30 593 C 2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapselten Taxol, Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Taxol ist ein in der Rinde verschiedener Eibenarten (Taxaceen) vorkommender Naturstoff der aus diesen Rinden [J. Amer. Chem. Soc., 93 : 2325 (1971)] bzw. neuerdings auch durch chemische Synthese [J. Amer. Chem. Soc., 1110 : 5917-5919 (1988)] gewonnen werden kann. Taxol verfügt im Vergleich zu bisher bekannten Zytostatika über einen völlig neuartigen Wirkmechanismus [Ann. NY. Acad. Sci. 466 : 733-744 (1986); Sartorelli, A (ed.): Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents. Academic Press, New York, 1981, pp. 483-507.] Die Substanz fördert die Aggregation der Mikrotubuli aus Tubulindimeren und stabilisiert die Mikrotubuli durch Hemmung ihrer Depolymerisation. Weiterhin kommt es zu einer abnormen Anordnung und Bündelung von Mikrotubuli während des gesamten Zellzyklus, was zur Bildung multipler mikrotubulärer Teilungssterne während der Mitose und damit zur Hemmung der normalen dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes führt. Da dadurch die vitale Zellfunktion in der Interphase und während der Mitose entscheidend beeinflusst wird, zeigt Taxol eine deutliche antineoplastische Aktivität gegen verschiedene Tumoren, u. a. gegen implantierte B16-Melanome, P388-Leukämie und gegen humane Mammatumoren.

Die Anwendbarkeit von Taxol ist durch seine geringe Wasserlöslichkeit stark eingeschränkt. Lösungsvermittler wie Cremophor (polyethoxyliertes Castoröl) und Alkohol verbessern die Löslichkeit, führen jedoch bei der Anwendung zu erheblichen Nebenwirkungen, z. B. zu anaphylaktoiden Reaktionen. Die Verdünnung solcher Lösungen mit physiologischer Kochsalzlösung zur Applikation hat den Nachteil, daß Taxol in physiologischer Kochsalzlösung keine ausreichende Stabilität (maximal 24 Stunden) besitzt. Eine dosislimitierende Nebenwirkung ist die Myelosuppression in erster Linie die Neutropenie [Semin. Oncol. 19 : 646-662 (1992)]. Liposomen bieten aufgrund ihres amphiphilen Charakters die Möglichkeit sowohl wasser- als auch lipidlösliche Substanzen einzuschließen bzw. zu inkorporieren.

Taxol als eine fast wasserunlösliche Substanz läßt sich mit hoher Effizienz in der Lipidphase von Liposomen geeigneter Zusammensetzung lösen, so daß die durch Cremophor EL beim Menschen beobachteten Toxizitäten einschließlich einer vermehrten Chylomikronenbildung nicht mehr auftreten sollte. Die therapeutische Effektivität von freiem, liposomal verkapseltem und nanopartikulärem Taxol werden an zwei Leukämien, der P388 und der L1210, in vitro verglichen. Während die Wachstumshemmung der P388-Zellen für alle 3 Arzneimitelformen gleich war, zeigte die L1210 eine größere Sensitivität gegenüber der nanopartikulären Form. Bei Testung aller 3 Zubereitungen an der P388 in vivo (12,5 mg/kg/4 Tage) waren die freie und liposomale Form in ihrer therapeutischen Effektivität vergleichbar, während nanopartikuläres Taxol akute Toxizitäten hervorrief [J. Microencapsul. 7 (2): 191-7 (1990)]. In einer weiteren Studie wurde Taxol in freier und liposomaler Form hinsichtlich der Antitumoraktivität an zwei humanen Glioblastomen im Nude-Modell getestet (12,5 mg/kg/4 Tage). Beide Formen führten zu einer signifikanten Verringerung des Tumorstwachstums [In-Vivo 6 (1): 23-7 (1992)]. Sharma et al. [Cancer Res. 53: 5877-81 (1993)] und Straubinger et al. [J. Natl. Cancer Inst. Monographs 15: 69-78 (1993)] berichten von einem signifikanten Antitumoreffekt von liposomalem Taxol (10-45 mg/kg) am murinen Taxol-resistenten Colon-26-Modell. In WO 93/18751 wird die Verkapselung von Taxol in Liposomen und die Verwendung der erhaltenen Produkte zur Behandlung von Krebserkrankungen beschrieben. Bevorzugt wird eine Kombination dieser Behandlung mit Hyperthermie. Die hergestellten Taxol-Liposomen zeigen eine verbesserte Stabilität.

Bisher wurde ein Patent (WO 93/18751) angemeldet, in dem eine Vielzahl von Taxol-Liposomen-Kombinationen beansprucht wird, von denen insbesondere Vesikel mit positiver Ladung auf der Basis von Cardiolipin, Phosphatidylcholin und Cholesterol hergestellt und untersucht wurden.

Das auf diese Weise verkapselte Taxol mußte jedoch in den Tierversuchen an vier aufeinanderfolgenden Tagen appliziert werden, da eine einmalige Gabe offensichtlich nicht zum gewünschten Antitumoreffekt führte.

Die Erfindung hat das Ziel, liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil und höherer Stabilität, damit erhöhter therapeutischer Wirksamkeit, zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe besteht darin, spezifische Formen der Verkapselung von Taxol zu entwickeln und diese, ggf. in Kombination mit anderen freien bzw. liposomal verkapselten Substanzen, zur Behandlung unterschiedlicher Tumorarten und Lokalisationen einzusetzen. Im Vordergrund steht hierbei neben der möglichst einmaligen Applikation des liposomalen Taxols auch die Verhinderung des dosislimitierenden neutropenischen Effektes, des unverkapselten Taxols z. B. durch Kombination mit liposomalem Carboplatin.

Die Aufgabe wird gemäß Anspruch 1 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Die Verkapselung wird erfindungsgemäß mittels Hochdruckhomogenisierung durchgeführt.

Die Experimente umfassen Arbeiten zur Präparation und Charakterisierung verschiedener taxolhaltiger Liposomentypen unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung.

Für die tierexperimentelle Prüfung wurden Liposomen nach Beispiel 1 eingesetzt. Es konnte u. a. an einem menschlichen Mamma-Karzinom (MaTu) gezeigt werden, daß diese Liposomenpräparation im Vergleich zum freien Taxol (4 Tage Therapie, je Tag 12,5 mg/kg) bereits nach einmaliger Applikation von 50 mg/kg eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit bei geringerer Hämatotoxizität aufwies (Abb. 1 + 2).

Als Verkapselungsmittel werden verwendet

- a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil, wie ein Lipid, ein Tensid oder einen Emulgator,
- b) eine geladene Lipidkomponente und/oder eine gesättigte Lipidkomponente, eine Etherlipidkomponente,
- c) ein Polymer
- d) eine Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzliche Hilfsstoffe, wie z. B. Nanopartikel enthält.

Das Amphiphil hat bevorzugt die in Anspruch 8 angegebene Formel I. Als geladene Lipidkomponente werden bevorzugt eingesetzt: das Anion des Dicetylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie Phosphatidylserin oder Phosphatidsäure oder das Anion eines Sphingolipids wie Sulfatid. In einer besonders günstigen

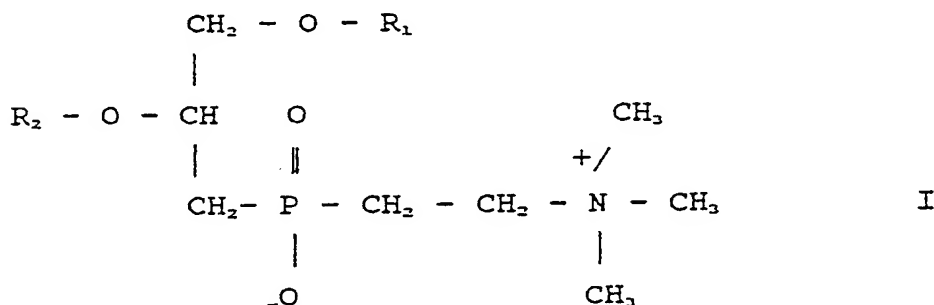
Phosphat-gepufferter (pH 7,2–7,4) Kochsalzlösung dispergiert. Die entstandene Dispersion multischichtiger Liposomen wird im Hochdruckhomogenisator (Gaulin Mikrolab 40) bei 700 bar behandelt. Die entstandene Liposomendispersion (SUV) ist bei 4 Grad Celsius kurzzeitig lagerfähig und eignet sich zur parenteralen (i. v.) Applikation. Zur längeren Lagerung eignet sich die Gelbildung bzw. die Lyophilisierung.

## Beispiel 2

Liposomen, hergestellt wie im Beispiel 1 werden mit einem geeigneten Vernebler aerosolisiert (z. B. Acro-Tech II) und somit der inhalativen Applikation zugänglich gemacht.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Verkapselung des Taxols ein Gemisch von membranbildenden Amphiphilen, in denen Taxol gelöst wurde, und eine wäßrige Phase ein- bis fünfzigmal einer Hochdruckhomogenisation mit Drucken von 50 bis 1600 bar (5–160 Mpa) unterzogen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Hochdruckhomogenisation ein dünner, trockener Lipidfilm unter Entfernung der Lösungsmittel durch Evaporation oder durch Sprühtrocknung hergestellt wird und der Lipidfilm in Wasser dispergiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen oder nach der Hochdruckhomogenisation eine Gefrier/Tau-Behandlung oder eine Gefriertrocknung/Redispersions-Behandlung erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Überführung in eine freifließende Dispersion erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion durch Filter mit einer Porenweite von 0,1 bis 1 µm filtriert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Verkapselungsmittel
  - a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil
  - b) eine geladene Lipidkomponente und/oder eine gesättigte Lipidkomponente und/oder eine Etherlipidkomponente,
  - c) ein Polymer
  - d) eine Trägerflüssigkeit eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Amphiphil ein Lipid, ein Tensid oder ein Emulgator ist.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil der allgemeinen Formel I,



worin R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-Alkanoyl, -Alkenoyl, -Alkyl, -Alkenyl bedeuten, eingesetzt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als geladene Lipidkomponente das Anion des Didecylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, das Anion eines Sphingolipids, eingesetzt wird oder daß ein chemisch modifiziertes Phosphatidylethanolamin, über das Proteine angekoppelt werden können, oder Etherlipide, eingesetzt werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß, Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerol oder Sulfatid eingesetzt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als neutrale Lipidkomponente Phosphatidylcholin eingesetzt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als gesättigte Lipidkomponenten Dipalmitoylphosphatidylcholin oder Dimyrestoylphosphatidylcholin eingesetzt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß Nanopartikel als zusätzliche Hilfsstoffe eingesetzt werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß in oder an der Membran der Vesikel als Polymer Polyethylenglycol (MG 2000–10000) enthalten ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

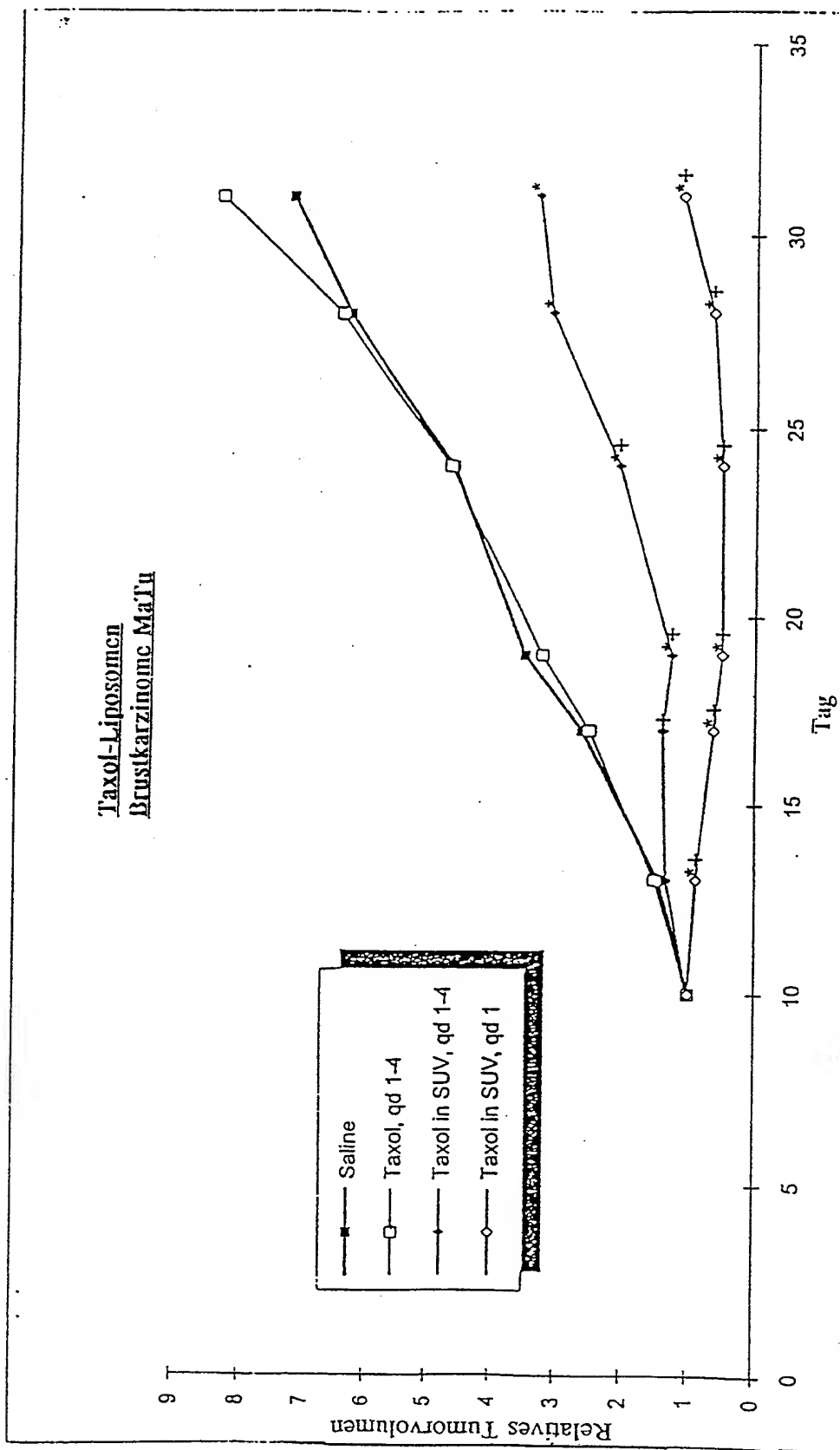


Abb. 2

\* signifikant zu Kontrollen  
+ signifikant zu freiem Taxol

Behandlung: i.p.,  
qd 1-4, 12,5 mg/kg/d  
qd1, 50 mg/kg

Taxol in SUV  
Mammakarzinom MaTu

Tiere: Ncr.nu/nu weiblich  
 Tumor: MaTu s.c.  
 Therapie: i.p.

| Gruppe | Zahl<br>d. Mäuse | Substanz             | Behandlung<br>(d) | Dosis<br>(mg/kg/inj.) | toxisch<br>Tode (d) | BWC (%)<br>d10-13 | Tumor<br>Wachstum<br>s. Abb. |
|--------|------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|------------------------------|
| A      | 8                | Saline               | 10-13             |                       |                     | 1                 |                              |
| B      | 8                | Taxol                | 10-13             | 12,5                  | 1 (16)              | -1                |                              |
| C      | 8                | Taxol in SUV<br>J918 | 10-13             | 12,5                  | 2 (21,32)           | 1                 |                              |
| D      | 8                | Taxol in SUV         | 10                | 50                    |                     | 2                 |                              |

Anmerkung: Liposomen besser als freies Taxol  
 Einmalige Behandlung = Therapie an 4 aufeinander folgenden Tagen (Depoteffekt)  
 gleiches Körpergewicht in allen Gruppen

Abb. 1